

10/530083

0 APR 2005

PCT/KR 03/02163

RO/KR 20.10.2003



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

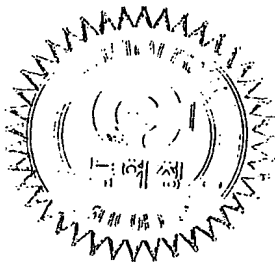
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0063378
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 10월 17일
Date of Application OCT 17, 2002

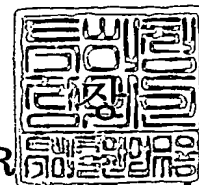
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

출원인 : 주식회사 바이오리더스 외 1명
Applicant(s) Bioleaders Corporation, et al.



2003 년 10 월 20 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.10.15
【제출인】	
【명칭】	주식회사 바이오리더스
【출원인코드】	1-2000-026462-9
【사건과의 관계】	출원인
【제출인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	김원준
【대리인코드】	9-1998-000674-0
【포괄위임등록번호】	2000-030837-8
【포괄위임등록번호】	1999-059594-5
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2002-0063378
【출원일자】	2002.10.17
【발명의 명칭】	인간 파필로마바이러스에 대한 백신용 벡터 및 그에 의해 형 질전환된 미생물
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-2002-0340506-37
【접수일자】	2002.10.17
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	발명자
【보정방법】	정정
【보정내용】	
【발명자】	
【성명의 국문표기】	성문희
【성명의 영문표기】	SUNG, Moon Hee

【주민등록번호】	570603-1024010
【우편번호】	305-301
【주소】	대전광역시 유성구 봉명동 538-8 동아벤처빌딩 908호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	부하령
【성명의 영문표기】	P00,Ha Ryoung
【주민등록번호】	610116-2002425
【우편번호】	302-121
【주소】	대전광역시 서구 둔산동 아너스빌 1619호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이종수
【성명의 영문표기】	LEE,Jong Soo
【주민등록번호】	740226-1251211
【우편번호】	305-308
【주소】	대전광역시 유성구 장대동 307-11
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정창민
【성명의 영문표기】	JUNG,Chang Min
【주민등록번호】	630118-1047119
【우편번호】	158-811
【주소】	서울특별시 양천구 목3동 618-13
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	홍승표
【성명의 영문표기】	HONG,Seung Pyo
【주민등록번호】	650826-1019514
【우편번호】	305-751
【주소】	대전광역시 유성구 송강동 송강그린아파트 310동 1503호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	김철중
【성명의 영문표기】	KIM, Chul Joong
【주민등록번호】	561213-1002325
【우편번호】	305-345
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 한올아파트 103동 801호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	박순희
【성명의 영문표기】	PARK, Sue nie
【주민등록번호】	540523-2567531
【우편번호】	120-090
【주소】	서울특별시 서대문구 홍제동 인왕산 현대아파트 103-202
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	표현미
【성명의 영문표기】	PYO, Hyun mi
【주민등록번호】	780514-2822617
【우편번호】	302-744
【주소】	대전광역시 서구 삼천동 가람아파트 2-901호
【국적】	KR

【취지】

특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인
김원준 (인)

【수수료】

【보정료】	0	원
【기타 수수료】	원	
【합계】	0	원

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002. 10. 17
【발명의 명칭】	인간 파필로마바이러스에 대한 백신용 벡터 및 그에 의해 형질 전환된 미생물
【발명의 영문명칭】	Vector for anti-HPV vaccine and Transformed Microorganism by the vector
【출원인】	
【명칭】	(주)바이오리더스
【출원인코드】	1-2000-026462-9
【출원인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【대리인】	
【성명】	김원준
【대리인코드】	9-1998-000674-0
【포괄위임등록번호】	2000-030837-8
【포괄위임등록번호】	1999-059594-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	성문희
【성명의 영문표기】	SUNG, Moon Hee
【주민등록번호】	570603-1024010
【우편번호】	305-301
【주소】	대전광역시 유성구 봉명동 538-8 동아벤처빌딩 908호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	부하령
【성명의 영문표기】	P00, Ha Ryoung
【주민등록번호】	610116-2002425
【우편번호】	302-121
【주소】	대전광역시 서구 둔산동 아너스빌 1619호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이종수
【성명의 영문표기】 LEE, Jong Soo
【주민등록번호】 740226-1251211
【우편번호】 305-308
【주소】 대전광역시 유성구 장대동 307-11
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 정창민
【성명의 영문표기】 JUNG, Chang Min
【주민등록번호】 630118-1047119
【우편번호】 158-811
【주소】 서울특별시 양천구 목3동 618-13
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 홍승표
【성명의 영문표기】 HONG, Seung Pyo
【주민등록번호】 650826-1019514
【우편번호】 305-751
【주소】 대전광역시 유성구 송강동 송강그린아파트 310동 1503호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김철중
【성명의 영문표기】 KIM, Chul Joong
【주민등록번호】 561213-1002325
【우편번호】 305-345
【주소】 대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 103동 801호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 박순희
【성명의 영문표기】 PARK, Sue nie
【주민등록번호】 540523-2567531

【우편번호】 120-090
【주소】 서울특별시 서대문구 홍제동 인왕산 현대아파트 103-202
【국적】 KR
【미생물기탁】
【기탁기관명】 한국생명공학연구원 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 10349BP
【수탁일자】 2002.10.04
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 9
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
 김원준 (인)
【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
【가산출원료】	19	면	19,000	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	0	항	0	원
【합계】	48,000	원		

【감면사유】 정부출연연구기관
【감면후 수수료】 24,000 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_1통 3. 기타첨부
 서류[미생물 기탁증명서 번역문]_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 파필로마바이러스의 표면항원에 대한 백신을 발현시키는 벡터, 상기 벡터에 의해 형질전환된 미생물 및 상기 형질전환된 미생물 또는 그 추출정제물을 이용한 백신에 관한 것이다.

본 발명은, 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 pgsB, pgsC 및 pgsA 중 어느 하나 또는 둘 이상과, 인간 파필로마바이러스(HPV)의 표면 항원단백질 유전자를 포함하는 백신제조용 표면발현 벡터를 제공한다.

【대표도】

도 1

【색인어】

폴리 감마 글루탐산 합성유전자, 표면발현, 인간 파필로마바이러스, 캡시드 단백질L1, 형질전환체, 대량생산

【명세서】

【발명의 명칭】

인간 파필로마바이러스에 대한 백신용 벡터 및 그에 의해 형질전환된 미생물 {Vector for anti-HPV vaccine and Transformed Microorganism by the vector}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 의한 그람음성 및 양성 미생물을 숙주로 하는 표면발현용 전환벡터 pHCE2LB:pgsA-HPVL1의 유전자 지도.

도 2A와 2B는 본 발명의 표면발현 전환벡터 (pHCE1LB:pgsA-HPVL1)로 형질 전환시킨 살모넬라균주와 유산균주내에서 pgsA와 융합된 HPV L1 항원의 융합단백질 발현 양상을 특히 항체로 웨스턴 블러팅한 사진.

도 3은 본 발명의 표면발현 전환벡터 pHCE1LB:pgsA-HPVL1로 형질전환시킨 락토바실러스 카제이 균주에서 항원기의 표면발현이 확인된 일정량의 균을 구강과 복강으로 각각 세번 혹은 두번 그리고 부스팅 투여한 마우스의 혈청내 HPV L1항원기에 대한 IgG 항체가 결과를 나타낸 그래프.

도 4는 본 발명에 의한 간접실험에서, 표면발현 전환벡터 pGNBCA-HB168로 형질 전환시킨 그람음성 미생물에서 B형 간염 바이러스의 표면항원기 단백질의 표면발현을 보여주는 웨스턴 블러팅 사진 및 형광-활성 세포 선별 측정 결과 그래프.

도 5는 본 발명에 의한 간접실험에서, 표면 발현용 벡터, pGNCA 및 전환벡터 pGNCA-HB168의 유전자 지도.

도 6은 본 발명에 의한 간접실시예에서, 표면발현 전환벡터 (pGNCA-HB168:A2, pGNA-HB168:A3 그리고 pGNHB-A:A4)로 형질전환시킨 그람음성 미생물에서 B형 간염 바이러스의 표면항원기 단백질의 표면발현을 보여주는 웨스턴 블러팅 사진 및 형광-활성 세포 선별 측정 결과 그래프.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<7> 본 발명은 파필로마바이러스의 표면항원에 대한 백신을 발현시키는 벡터, 상기 벡터에 의해 형질전환된 미생물 및 상기 형질전환된 미생물 또는 그 추출정제물을 이용한 백신에 관한 것이다.

<8> 미생물의 세포표면에 원하는 단백질을 부착하여 발현시키는 기술을 세포표면발현(cell surface display) 기술이라 한다. 단백질의 분비 mechanism에 대한 지식이 증가되고 이 지식에 분자 생물학적 지식을 도입하여 이를 응용한 기술에 해당된다. 이 세포표면발현기술은 박테리 아나 효모 등 미생물의 표면 단백질을 표면발현 모체(surface anchoring motif)로 사용하여 외래 단백질을 표면에 발현시키는 기술로서 재조합 생백신의 생산, 펩타이드/항체 library 제작 및 screening, whole cell absorbent, 전세포 생물 전환 촉매등 다양한 응용범위를 가지고 있는 기술이다. 즉, 이 기술은 어떤 단백질을 세포 표면에 발현시키는가에 따라 그 응용범위가

결정되어지며, 따라서 세포표면발현기술을 이용한 산업적 응용 잠재력은 상당하다고 할 수 있다.

<9> 성공적인 세포표면발현기술을 위해서는 표면발현모체가 가장 중요하다. 얼마나 효과적으로 외래단백질을 세포표면에 발현시킬 수 있는 모체를 선정하고 개발하느냐가 이 기술의 핵심이 된다.

<10> 따라서 다음의 성질을 가진 표면발현모체를 선정해야 한다. 먼저 외래단백질을 세포표면까지 보내기 위해 세포내막을 통과할 수 있도록 도와주는 분비신호가 있을 것, 둘째 세포외막 표면에 안정되게 외래단백질이 부착될 수 있도록 도와주는 표적신호가 있을 것, 셋째 세포 표면에 다량으로 발현되나 세포의 성장에 거의 영향을 미치지 않을 것, 넷째 단백질의 크기에 관계없고 외래단백질의 3차원 구조 변화가 없이 안정적으로 발현될 것 등의 조건을 갖는 모체를 선정해야 한다. 하지만 위의 조건을 모두 만족시키는 표면발현 모체는 아직까지 개발되지 않은 상태이고 현재까지는 상기한 경우의 단점을 보완하는 수준이다.

<11> 지금까지 알려져 사용된 표면발현모체로는 세포 외막 단백질, 지질 단백질 (lipoprotein), 분비 단백질(secretory protein), 편모 단백질과 같은 표면기관 단백질 등 크게 4가지이다. Gram negative bacteria의 경우 LamB, PhoE[Charbit et al., J. Immunol., 139: 1658-1664 (1987) ; Agterberg et al., Vaccine, 8: 85-91 (1990)], OmpA 등과 같은 세포 외막에 존재하는 단백질을 주로 이용하였고, 지질단백질인 TraT[Felici et al., J. Mol. Biol., 222: 301-310 (1991)], peptidoglycan associated lipoprotein(PAL) [Fuchs et al.,

Bio/Technology, 9: 1369-1372(1991)] 그리고 Lpp[Francisco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 489: 2713-2717 (1992)] 등 역시 이용되었으며, FimA나 type 1 fimbriae의 FimH adhesin과 같은 fimbriae protein[Hedegaard et al., Gene, 85: 115-124 (1989)], PapA pilu subunit와 같은 pili protein등을 세포 표면발현 모체로 이용하여 외래 단백질의 발현을 시도하기도 하였다. 이 외에도 빙핵활성 단백질(ice nucleation protein) [Jung et al., Nat. Biotechnol, 16: 576-560 (1998), Jung et al., Enzyme Microb. Technol, 22(5): 348-354 (1998), Lee et al., Nat. Biotechnol, 18: 645-648 (2000)], *Klebsiella oxytoca*의 pullulanase[Kornacker et al., Mol. Microb., 4: 1101-1109 (1990)], *Neisseria*의 IgA protease[Klauser et al., EMBO J., 9:1991-1999 (1990)] 등이 표면발현 모체로 쓰이고 있다는 보고가 있다. Gram positive bacteria를 이용하는 경우에는 *Staphylococcus aureus* 유래의 protein A를 표면발현 모체로 사용하여 말라리아 항원을 효과적으로 발현시킨 보고가 있으며, *Lactic acid bacteria*의 표면 coat 단백질을 이용하여 surface display에 이용했다는 보고 등 Gram positive bacteria의 표면 단백질을 모체로 이용했다는 보고가 있다.

<12> 본 발명자들은 바실러스 속 균주 유래의 폴리 감마 글루탐산의 합성 복합체 유전자 (pgsBCA)를 새로운 표면발현 모체로 활용하는 것에 대하여 예의 검토하고 연구한 바, pgsBCA 유전자를 이용하여, 외래단백질을 미생물의 표면에 효과적으로 발현시키는 새로운 벡터, 미생물의 표면에 외래단백질을 다량 발현시키는 방법을 개발한 바 있다(출원번호 10-2001-48373).

<13> 상기에서 소개된 표면발현 모체들을 이용하여 병원체의 항원 또는 항원 결정기를 유전공학적인 방법을 이용하여 대량 생산이 가능한 세균에서 안정하게 발현시키고자 하는 연구가 많이 시도되었다. 특히 비병원성의 세균 표면에 외래 면역원을 발현시켜 살아있는 상태로 경구투여를 할 경우 종래의 약독화된 병원성 세균이나 바이러스를 이용한 백신들 보다 더 지속적이고

강한 면역반응을 유도할 수 있다고 보고되었다. 이러한 면역반응 유도는 세균의 표면 구조물들이 표면발현된 외래단백질의 항원성(antigenicity)을 증가시키는 adjuvant 작용을 하기 때문이며 살아있는 상태의 균에 대한 체내의 면역 반응에 의한 것으로 알려져 있다. 이러한 표면발현 시스템을 이용한 비병원성 세균의 재조합 생백신의 개발은 주목할 만하다.

<14> 세계 보건 기구(World Health Organization, WHO)에 의하면 매년 전세계적으로 50만명 이상의 자궁 경부암 환자가 발생하고 있으며, 특히 개발 도상국에서는 여성 사망의 주원인이 되고 있다(Pisani, P., Parkin, D. M., Ferlay, J. (1993) Int J Cancer 55: 891-903). 이러한 자궁경부암을 일으키는 원인 중에 인간 파필로마바이러스(human papillomavirus, 이하 HPV라 칭함)가 있다. 파필로마바이러스는 고도로 종 특이적인 작은 DNA 종양바이러스로 사람, 소, 토끼, 양 등의 포유동물에 감염되어 피부나 점막에서 사마귀나 유두종을 유발하는 파포바비리대(Papovaviridae) 과의 일종이다(Pfister, H. (1987) Adv. Cancer Res. 48, 113-147). 그 중에서도 인간 파필로마 바이러스는 약 70여 유형(type)이 알려져 있으며, 그 중에서 약 20여 종(type)이 구강이나 생식기관의 피부점막에서 종양을 유발하는데, 특히 HPV 16과 HPV 18 형(type)은 여성암의 대부분을 차지하고 있는 자궁경부암을 유발한다고 알려져 있다(Zur Hausen H, (1988) Mol. Carcinogenesis 8: 147-150).

<15> 어떠한 바이러스에 대한 백신을 개발하기 위해서는 적당한 동물 배양 시스템이 갖춰져야 하고 이를 이용하여 바이러스 입자를 대량으로 생산, 정제할 수 있어야 한다. 그러나 HPV는 최종적으로 분화가 끝난 상피세포(keratinocytes)에서만 바이러스 비리온(virion)을 형성하기 때문에 시험관 내(

in vitro) 또는 생체 내(*in vivo*)에서 바이러스 입자를 대량으로 생산하기 어려운 문제점이 있어 연구에 필요한 바이러스 입자의 충분한 생산은 물론 자궁 경부암에 대한 예방용 또는 치료용 백신을 실용화하는데 어려움이 있어 왔다. 또한 HPV는 종(species)에 특이적으로 반응하므로 백신의 효율성을 검증하기 위한 동물 모델 시스템의 개발이 어려워 아직까지 대량생산 및 백신의 개발이 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

<16> 자궁 경부암과 관련된 백신 개발의 방법으로는 크게 예방 백신(prophylactic)과 치료 백신(therapeutic) 두 가지 형태에 초점이 맞추어지고 있다. 예방백신은 HPV L1/L2 항원 단백질에 의해 강한 중화항체(neutralizing antibody)가 생성되게 함으로써 숙주가 HPV에 감염되는 것을 막고, 이미 감염되었더라도 더 이상 병이 진전되지 않도록 하는데 목적이 있다. 한편, 치료 백신은 HPV E6/E7을 대상으로 하되 특이적인 세포성 면역을 유도시켜 이미 형성된 병반이나 악성 종양을 퇴화시키는 것을 목적으로 하고 있다.

<17> 지금까지 박테리아, 효모, 동물 세포 등에서 HPV 구성체의 일부를 재조합 기술로서 생산하는 재조합 단백질과 직접 주요 epitope 부위를 합성한 합성 펩타이드를 백신으로 사용하고 자 하는 연구가 진행되어 왔다. 재조합 단백질은 일반적으로 널리 쓰이고 있는 생산 방법들인 박테리아, 효모, 벡룰로바이러스(baculovirus), 재조합 백신용 바이러스(recombinant vaccinia virus) 등의 시스템을 사용하여 생산하고 있으며, 이러한 방법에 의해 HPV의 재조합 단백질을 생산하는 연구와 일부 생산된 재조합 단백질을 이용하여 혈청 내 HPV에 대한 항체 형성능 및 세포성 면역 유도 능력 등을 검증하는 연구가 이루어지고 있다. 그러나 동물 및 곤충 세포를 이용한 바이러스 시스템의 경우 배양과정에서의 '오염 및 정제과정에서의 어려움 등의

문제점이 있고, 합성펩타이드의 합성을 통한 경우를 포함하여 전체적인 경제적 고비용이 들어간다는 단점이 있어 상업적인 제약이 따른다.

<18> 재조합 생 바이러스 백신(Live recombinant vaccinia virus)으로서 HPV L1 바이러스 유사 입자(virus like particle: 이하 VLP로 칭함)를 유선 세포 배양을 통해 생산하는 방법이 알려져 있으며(Hagensee, M. E., Yaegashi, N., Galloway, D. A. (1993) J Virol 67, 315-322), 실제로 이 시스템에서 합성된 HPV E6/E7 단백질을 종양 세포를 주입한 쥐에 투여하였을 경우 종양 형성이 저해되거나 지연된다는 보고가 있다(Gao, L., Chain, B., Sinclair, C. (1994) J. Gen Virol 75, 157-164, Meneguzzi, G., Cern, C., Kieny, M. P. (1991) Virology 181: 62-69). 그러나 다른 경우들과 마찬가지로 생 바이러스 백신을 이용할 경우 과도한 바이러스 복제로 인한 문제점을 유발할 수 있으므로 실제 연구에 그치는 경우가 많고 상업화까지 오랜 기간과 상당한 임상실험이 필요한 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 바이러스의 복제능이 저해되거나 결핍된 바이러스 벡터 개발에 대한 연구도 이루어지고 있으나 아직 상용화된 경우는 없다(Moss, B. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11341-11348).

<19> 한편 박테리아 벡터를 이용한 백신 개발 연구도 활발히 진행 중인데, 약화된 살모넬라균 (attenuated *Salmonella typhimurium*)에서 합성된 HPV 16 VLP가 쥐의 점막이나 전신에서 항원 특이적인 항체의 생성을 유도한다는 보고도 있다(Denis, Nardelli-haeffliger., Richard, B., S. Roden. (1997) Infection and immunity 65: 3328-3336). 합성 펩타이드를 이용한 백신은 면역 반응을 유도하는데 필요한 에피토프만을 합성하여 접종(vaccination)시키는 것으로, 이미 HPV 16 E6/E7에 대한 세포성 면역 반응(Cytotoxic T Lymphocyte ; CTL)을 일으키는 에피토프가 밝혀져 있다(Ressing, M. E., Sette, A., Brandt, R. M. (1995) J Immunol 154, 5934-5943).

<20> 이러한 시도 이외에 식물에서 바이러스의 항원을 생산하기 위해 토마토 및 감자 등의 채소류를 이용하여 그 형질 전환체 채소류 자체를 경구용 백신(oral vaccine) 또는 식용 백신(edible vaccine)으로 사용하려는 연구가 진행 중에 있다. 대표적인 예로서 간염 바이러스 표면 항원 입자(Hepatitis B surface antigen particle) (Thavala, Y. F. and C. J. Artzen. (1995) Pro Natl Acad Sci USA 92, 3358-3361)와 파필로마바이러스의 캡시드 L1과 L2단백질(출원번호 10-2000-0007022)이 그 예이다. 그러나 식물을 이용한 시스템의 경우 발현되는 HPV L1 단백질의 양이 적고 정제의 문제가 있어 역시 상업적인 제약이 따른다는 문제가 있다.

<21> 따라서, 인간 파필로마바이러스 유래의 구강 또는 생식기관의 피부점막의 종양에 대한 예방과 치료를 위해, 보다 경제적이고 안정적으로 인간 파필로마바이러스 항원을 제조하는 방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<22> 전기한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 본 발명은, 미생물의 표면발현 시스템을 활용하여 HPV 항원을 제조할 수 있는 벡터 및 상기 벡터에 의해 형질전환된 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<23> 또한 본 발명은, HPV 항원이 표면에 발현된 상기 형질전환된 미생물, 상기 미생물로부터 조추출된 HPV 항원 또는 상기 미생물로부터 정제된 HPV 항원을 유효성분으로 하는 점막 종양 치료 또는 예방용 백신을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

【발명의 구성 및 작용】

- <24> 전기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 pgsB, pgsC 및 pgsA 중 어느 하나 또는 둘 이상과, 인간 파필로마바이러스(HPV)의 표면 항원단백질 유전자를 포함하는 백신제조용 표면발현 벡터에 관한 것이다.
- <25> 본 발명에서 상기 유전자 pgsB, pgsC, pgsA는 각각 서열 1, 서열 2, 서열 3에 기재된 염기서열로 이루어져 있다.
- <26> 본 발명에서, 상기 표면 항원단백질 유전자로는 HPV 표면 구성체 단백질을 암호화하는 유전자라면 모두 사용될 수 있으며, 인간 파필로마바이러스의 캡시드인 HPV 16 L1, HPV 16 L2, HPV 18 L1 또는 HPV 18 L2 항원단백질 유전자를 단독으로 이용할 수 도 있고, 둘 이상을 복합적으로 이용할 수도 있다. 그러나 바람직하게는, HPV의 주요 캡시드인 L1 항원단백질의 유전자를 사용하는 것이 좋다.
- <27> 또한 본 발명에서는 상기 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자에는 pgsA가 포함되는 것이 바람직하다.
- <28> 본 발명은 또한, 상기 백신제조용 벡터로 형질전환된 미생물에 관한 것이다. 본 발명에 적용될 수 있는 미생물은, 생체 적용시 독성이 없거나, 감독화된(attenuated) 미생물이라면 어느 것이라도 가능할 것이다. 예를들면, 그람음성균으로 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라 등을, 그람양성균으로 바실러스, 락토바실러스, 락토코커스, 스테필로코커스, 리스테리아 모노사이토제네스 및 스트렙토코커스 등을 적절히 선택할 수 있다.

- <29> 본 발명은 또한, 항원 단백질이 표면에 발현된 제 5 항에 의한 미생물 자체를 이용하거나, 상기 미생물을 파괴하고 세포막 성분을 조추출한 물질을 이용하거나, 상기 미생물로부터 정제한 항원 단백질을 유효성분으로 함유하는 각종의 점막 종양 치료 또는 예방용 백신을 제공한다. 즉, 본 발명에 의한 백신은 HPV에 의해 유발되는, 구강이나 생식기관 등의 점막에 발생한 종양, 특히 여성 자궁경부암의 치료 또는 예방약으로 이용될 수 있다.
- <30> 본 발명에 의한 백신은, 경구용 또는 식용으로 섭취할 수도 있고, 피하 또는 복강에 주사할 수도 있으며, 생식기의 세척액으로도 사용 할 수 있다.
- <31> HPV의 감염이 점막 조직 표면(mucosal surface)에서 일어나므로 점막면역에 의한 감염의 방어는 매우 중요하다. HPV의 항원을 표면에 발현하는 미생물은 점막에서의 항체형성(mucosal response)을 더 효과적으로 유도할 수 있는 장점을 가지고 있어 상기의 형질전환된 미생물 자체를 이용한 경구용 백신이 비경구용(parenteral) 백신 보다 HPV의 방어에 더 효과적일 것으로 기대된다.
- <32> 구체적으로 본 발명은, 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리 감마 글루탐산 합성 복합체의 유전자 중 pgsA를 포함하고 pgsA의 C-말단에 HPV L1의 N-말단을 연결하여 HPV L1을 융합단백질 형태로 그람음성 및 양성세균의 표면에 발현시킬 수 있는 백신용 표면발현 전환백터 pHCE1LB:pgsA-HPVL1(도 1 참조) 및 이에 의해 형질전환된 미생물을 제공한다. 상기 백신제조용 백터로 형질전환된 대장균은 별도로 기탁하였다(KCTC 10349BP).

- <33> 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- <34> 특히 하기 실시예에서는 HPV 16 L1 항원단백질 유전자를 적용하였으나, HPV 16 L1, HPV 16 L2, HPV 18 L1, HPV 18 L2 등 HPV의 캡시드인 어떠한 항원단백질 유전자를, 단독으로 또는 둘 이상을 복합적으로 이용할 수도 있을 것이다.
- <35> 또한 하기 실시예에서는 바실러스 서브틸리스 청국장(*Bacillus subtilis* var. chungkookjang, KCTC 0697BP)로부터 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자 pgsBCA를 획득하여 이용하였으나, 유전자는 폴리감마글루탐산을 생산하는 모든 바실러스 속 균주로부터 pgsBCA를 획득하여 제조된 벡터 또는 이 벡터를 이용한 형질전환미생물 등도 본 발명의 범위에 포함될 것이다. 예컨대, 바실러스 서브틸리스 청국장에 존재하는 pgsBCA 유전자의 염기서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 타 균주 유래의 pgsBCA 유전자를 사용하여 백신용 벡터를 제조하거나 이를 이용하는 것도 본 발명의 범위에 포함될 것이다.
- <36> 또한, 하기 실시예에서는 유전자 pgsBCA 중에서 pgsA만을 활용하여 표면 발현용 벡터를 제작하였으나, 간접실시예로부터 유추해 볼 수 있듯이, 유전자 pgsBCA의 전부 또는 일부만을 사용하여 백신용 벡터를 제작하는 것도 본 발명의 범위에 포함될 것이다.
- <37> 또한, 하기 실시예에서는, 상기 벡터에 대한 숙주로서, 그람음성 세균인 살모넬라 타이피와 그람양성세균인 락토바실러스만을 사용하였으나, 이 세균 이외에 여하한 그람양성균 또는 그람양성균도 본 발명에 의한 방법으로 형질전환시키면 동일한 결과를 얻을 수 있다는 사실도 당업자에게는 자명할 것이다.

<38> 또한 하기 실시예에서는, 백신용 벡터로 형질전환된 미생물 자체를 생백신으로 생체에 적용한 예만이 제시되어 있다. 그러나, 백신관련 기술분야의 지식으로 보아, 상기 미생물로부터 조추출된 발현단백질(즉 HPV 항원단백질) 또는 정제된 발현단백질을 생체에 적용하더라도 동일하거나 유사한 결과를 얻을 수 있음은 당연할 것이다.

<39> 실시예 1 : 표면발현용 전환 벡터 pHCE2LB:pgsA:HPV L1의 제조

<40> 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자(pgsBCA) 중 pgsA를 이용하여 그람음성 미생물 및 그람 양성 미생물을 숙주로 하여 인간 파필로마바이러스 type16(이하 파필로마바이러스를 HPV라 칭함)의 주요 캡시드 단백질 L1을 표면발현 할 수 있는 전환벡터 pHCE2LB:pgsA-HPVL1을 제조하였다.

<41> 우선, 그람음성 미생물을 숙주로 하는 표면발현용 벡터 pGNA(출원번호10-2001-48373, 출원인)에 HPV의 L1을 코딩하는 유전자를 도입하기 위하여, pUC19에 클론되어 있는 약 1.5kb 의 사람 파필로마바이러스 유전자를 주형으로 사용하고, HPV L1을 코딩하는 유전자 서열 4 (5'-cgc ggatcc tct ctt tgg ctg cct ag-3) 및 서열 5 (5'-gga aagctt tta tta cag ctt acg ttt ttt g-3)의 염기서열을 갖는 올리고 뉴클레오타이드를 프라이머로 이용한 중합 효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. 이 결과 증폭된 유전자 부위의 크기는 1518bp였다.

<42> 상기 프라이머 서열 4 및 서열 5에는 표면발현용 벡터 pGNA에 존재하는 제한효소 BamH I 과 Hind III 인식부위가 존재하도록 구성되었다. 상기 증폭된 HPV L1 항원 유전자를 제한효소 BamH I, Hind III로 절단하여 미리 준비된 표면발현용 벡터 pGNA의 폴리 감마 글루탐산 합성에

관여하는 세포외막 단백질의 유전자 pgsA의 C-말단 부위에 번역코돈을 맞추어 연결하여 전환 벡터 pGNA-HPVL1를 제조하였다.

<43> 제조된 전환 벡터 pGNA-HPVL1에서 HCE 프로모터, pgsA 그리고 HPV L1을 포함하는 절편을 얻기 위해서 pGNA-HPVL1을 제한효소인 NheI과 ScaI으로 절단하여 절편을 준비하고 그람양성의 범용 벡터인 pAT19의 multicloning site내 제한효소인 XbaI과 SmaI 부위로 그 절편을 연결하여 전환벡터 pHCE2LB:pgsA-HPVL1(도 1)을 제조하였다.

<44> 본 표면발현용 벡터로 대장균을 형질전환하고, pHCE2LB:pgsA-HPVL1를 함유하는 대장균을 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC, 대전광역시 유성구 어은동 52 소재)에 KCTC 10349BP 의 수탁번호로 기탁하였다.

<45> 실시예 2 : pgsA와 융합된 HPV L1의 표면발현

<46> 상기 표면발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA-HPVL1를 이용하여 그람음성 세균인 살모넬라 타이피 Ty21a에 형질전환시킨 후 살모넬라 타이피 Ty21a에서 pgsA와 융합된 HPV의 L1항원의 단백질 발현을 조사하였고, 그람양성 세균인 락토바실러스에 형질전환시킨 후 락토바실러스내 pHCE2LB:pgsA-HPVL1 플라스미드의 존재를 확인하고 pgsA와 융합된 HPV L1항원의 단백질 발현을 조사하였다 (도 2참조).

<47> 폴리 감마 글루탐산을 합성하는 유전자 pgsA의 C-말단과 융합된 HPV L1항원의 세균 발현은 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 HPV L1에 대한 특이 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅 (western immunoblotting)을 수행하여 확인하였다.

<48> 구체적으로 pHCE2LB:pgsA-HPVL1으로 형질전환된 살모넬라 타이피 Ty21a을 항생제(에리스로마이신) 100 mg/L이 첨가된 50 ml의 LB배지(효모엑기스 5 g/L, 트립톤 10 g/L, 소금 5 g/L, pH 7.0)를 포함한 500 ml 플라스크에서 증식시킴으로 표면발현을 유도하였다. 이와는 별도로, pHCE2LB:pgsA-HPVL1으로 형질전환된 락토바실러스 카제이를 MRS배지(Lactobacillus MRS, Becton Dickinson and Company Sparks, USA), 37℃에서 정체 배양, 증식시킴으로 표면발현을 유도하였다.

<49> , 발현이 유도된 살모넬라 타이피 Ty21a 및 락토바실러스 카제이를 동일한 세포 농도에서 얻은 단백질을 디네이처(denature)시켜 시료를 준비하고, 이를 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동으로 분석한 다음 분획된 단백질을 PVDF (polyvinylidene-difluoride membranes, Bio-Rad) 멤브레인에 옮겼다. 단백질들이 옮겨진 PVDF 멤브레인을 블로킹 완충용액 (50 mM 트리스 염산, 5 % 스킵 밀크(skim milk), pH 8.0)에서 1시간 동안 흔들어 블로킹시킨 다음 HPV L1에 대한 마우스 유래의 단클론 1차 항체를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 12시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 바이오틴이 접합된 마우스에 대한 2차 항체를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 아비딘-바이오틴 (avidin-biotin)시약을 1시간 동안 반응시켜 다시 세척하였다. 세척된 멤브레인에 기질과 발색시약으로 H₂O₂ 와 DAB 용액을 첨가하여 발색시키고 HPV L1에 대한 특이 항체와 상기 융합단백질간의 특이적인 결합을 확인하였다(도 2).

<50> 도 2의 A에서 레인 1은 형질전환되지 않은 숙주세포인 살모넬라 타이피 Ty21a, 레인 2, 3은 형질전환된 pHCE2LB:pgsA-HPVL1/살모넬라 타이피 Ty21a, 도 2B에서 레인 1은 형질전환되지 않은 락토바실러스 카제이, 레인 2는 형질전환된 pHCE2LB:pgsA-HPVL1/락토바실러스 카제이이다. 도면에서 보는 바와 같이, pHCE2LB:pgsA-HPVL1 플라스미드에 의해서 약 97.4 KDa의 융합

단백질 밴드를 확인 할 수 있었다. pgsA가 약 41.8KDa이고, L1 단백질이 약 55.6KDa이므로 상
기 97.4KDa를 나타내는 밴드는 pgsA와 L1 단백질이 융합된 융합단백질임을 알 수 있다.

- <51> 실시예 3 : HPV L1항원을 표면발현하는 락토바실러스의 생백신으로서의 유용성 조사
- <52> 상기 표면발현용 전환백터 pHCE2LB:pgsA-HPVL1을 그람양성세균인 락토바실러스 카제이에
형질전환시키고 실시예 2에서와 같은 방법으로 상기 항원을 락토바실러스 카제이에서 표면발
현을 유도한 후 폴리감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막단백질 pgsA와 융합된 HPV의 L1
항원의 항원성을 조사하였다.
- <53> 구체적으로, 본 발명의 표면발현 전환백터 pHCE2LB:pgsA-HPVL1을 락토바실러스 카제이에
형질전환시켜 각각의 동일한 세균농도가 되도록 수확한 세포를 완충용액 (PBS buffer, pH7.4))
으로 여러 번 세척을 하고, 항원이 표면발현된 락토바실러스 5×10^9 균을 4-6주령의 BALB/c 마
우스의 구강으로 1일 간격으로 세 번 그리고 2주 뒤에 역시 1일 간격으로 세 번 투여하였다.
이와는 별도로, 항원이 표면발현된 락토바실러스 1×10^9 균을 마우스의 복강으로 3일 간격으로
두 번 그리고 4주 뒤에 역시 3일 간격으로 두 번 투여하였다.
- <54> 경구와 복강투여 후 4주 뒤에 각각의 마우스군 혈청을 취하여 혈청내 HPV L1 항원에 대
한 IgG 항체 생성을 엘리자 방법(ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent assay)으로 항원에 대한
항체가를 측정하였다(도 3). 도 3에서 은 pHCE2LB:pgsA:HPV으로 형질전환된 락토바실러스
카제이(복강투여), 은 pHCE2LB:pgsA:HPV으로 형질전환된 락토바실러스 카제이(경구투여) 그
리고 은 형질전환되지 않은 락토바실러스 카제이를 동일한 방법으로 경구투여한 것이다.

- <55> 그 결과 도 3에서 보는 바와 같이, pHCE2LB:pgsA-HPVL1으로 형질전환시킨 락토바실러스 카제이를 투여한 BALB/c 마우스군의 혈청 회석액에서 인간 HPV의 L1 항원에 대한 IgG 항체가 대조군인 BALB/c 마우스의 그것보다 상당히 높게 나타남을 확인하였다.
- <56> 따라서 본 발명에 의한 형질전환 미생물을 이용하는 경우, HPV에 대한 항체를 형성할 수 있으며, 이들 형질전환 미생물이 생백신으로 활용될 수 있음을 알 수 있다.
- <57> 간접실시에 : pgsB, pgsC 및 pgs A의 조합이 삽입된 백신용 벡터의 제작 및 이를 이용한 외래 단백질 표면발현 실험
- <58> 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 pgsB, pgsC 및 pgsA 중 어느 하나 또는 둘 이상과, 본 발명에 의한 HPV 항원단백질은 아니지만, 외래 단백질을 코딩하는 유전자가 포함된 표면발현용 벡터를 제작이 가능하며, 이들 벡터를 미생물에 형질전환함으로써 외래 단백질이 미생물의 표면에 발현됨을 확인하였다.
- <59> 이에 의해 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 pgsB, pgsC 및 pgsA 중 어느 하나 또는 둘 이상과, 본 발명에 의한 HPV 항원단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 백신용 벡터를 제작할 수 있음을 간접적으로 확인한 것이다.
- <60> 간접실시예에서 플라스미드 pGNBCA, pGNCA는 각각 본 발명에서의 플라스미드 pGNpgsBCA, pGNpgsCA와 동일한 것이다.
- <61> (간접실시예 1) 표면 발현용 전환 벡터 pGNBCA-HB168의 제조 및 S 항원의 중화항체 형성 항원기의 표면발현

- <62> 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자(pgsBCA)를 이용하여 그람음성 미생물을 숙주로 하여 B형 간염 바이러스 S 항원의 중화항체 형성 항원기를 표면 발현할 수 있는 전환 벡터 pGNBCA-HB168을 제조하였다.
- <63> 그람음성 미생물을 숙주로 하는 표면 발현용 벡터 pGNBCA에 B형 간염 바이러스 S 항원 유전자를 도입하기 위하여, 범용 클로닝 벡터인 pUC8에 클론되어 있는 약 1.4 kb의 B형 간염 바이러스 유전자를 주형으로 사용하고, 서열 6(5-ctg gga tcc caa ggt atg ttg ccc gtt tg-3) 및 서열 7(5-tga agc tta tta gga cga tgg gat ggg aat-3)의 염기서열을 갖는 올리고 뉴클레오타이드를 프라이머로 이용한 중합효소 연쇄반응을 수행하여 S항원 유전자를 증폭하였다. 이때 증폭된 유전자 부위는 168 bp크기였다.
- <64> 상기 서열 6 및 서열 7의 프라이머는 표면 발현용 벡터 pGNBCA에 존재하는 제한효소 BamH I과 Hind III 인식부위가 존재하도록 구성되었다. 상기 증폭된 B형 간염 바이러스 S 항원 유전자를 제한효소 BamH I, Hind III로 절단하여 미리 준비된 표면 발현용 벡터 pGNBCA의 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자의 C-말단 부위에 번역코돈을 맞추어 연결하였다. 이렇게 제조한 전환 벡터 pGNBCA-HB168를 제조하였다.(도5참조)
- <65> 상기 표면 발현용 벡터 pGNBCA-HB168를 이용하여 대장균에서 B형 간염 바이러스 S 항원의 중화항체 형성 항원기의 표면발현을 조사하였다.
- <66> 실시예 2에서 제작된 발현 벡터를 대장균에 형질전환시킨 다음 항생제(암피실린) 100 mg/L이 첨가된 50 ml의 엘비배지 (효모엑기스 5 g/L, 트립톤 10 g/L, 소금 5 g/L, pH 7.0)를 포함한 500 ml 플라스크에서 증식시킴으로 표면 발현을 유도하였다.

<67> 폴리감마글루탐산을 합성하는 유전자의 C-말단과 융합된 S 항원의 중화항체 형성 항원기의 세균 발현은 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 S 항원에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅 (western immunoblotting)을 수행하여 확인하였다. 구체적으로 동일한 세포 농도에서 얻은 단백질을 디네이처(denature)시켜 시료를 준비하여 이를 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동으로 분석한 다음 분획된 단백질들을 PVDF 멤브레인에 옮겼다. 단백질들이 옮겨진 PVDF 멤브레인을 블로킹 완충용액 (50 mM 트리스 염산, 5 % 스킴 밀크(skim milk), pH 8.0)에서 1시간 동안 흔들어 블로킹시킨 다음 S 항원에 대한 양 유래의 폴리클론 1차 항체를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 12시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 바이오틴이 접합된, 양에 대한 2차 항체를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 아비딘-바이오틴 (avidin-biotin) 시약을 1시간 동안 반응시켜 다시 세척하였다. 세척된 멤브레인에 기질과 발색시약으로 H_2O_2 와 DAB 용액을 첨가하여 발색시키고 S 항원에 대한 특이 항체와 상기 융합단백질간의 특이적인 결합을 확인하였다(도 4에서 A). 도에서 라인 1은 형질전환되지 않은 숙주세포인 JM109, 라인 2는 형질전환된 pGNBCA-HB168/JM109이다. 도면에서 보는 바와 같이, pGNBCA-HB168 플라스미드에 의해서 약 48 KDa의 융합 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다.

<68> 또한 S 항원의 중화항체 형성 항원기가 대장균의 표면에 위치 발현됨을 직접 확인하기 위하여 outer membrane fractionation 방법으로 발현을 유도한 대장균의 soluble, inner membrane, outer membrane 등 각각을 분리한 후 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 S 항원에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅 (western immunoblotting)을 수행하여 확인하였다. 구체적으로 상기의 방법으로 융합단백질의 표면 발현이 유도된 대장균을 형질전환되지 않은 대장균과 동일한 세포 농도가 되도록 수확하고 세포를 완충용액 (10mM HEPES buffer, pH 7.4)으

로 여러 번 세척한 다음, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lysozyme, 1 mM PMSF 그리고 1 mM EDTA가 포함이 된 완충용액으로 부유시키고 4°C에서 10분 동안 반응시킨 후, DNase (0.5 mg/ml) 와 RNase (0.5 mg/ml) 을 첨가 후 sonication으로 세포를 파괴 후 Intact 대장균과 cellular debris이 4°C, 20분 동안의 10,000 X g 원심분리에 의해서 분리가 되고 분리된 대장균의 cellular debris이 4°C, 2시간 동안의 15,000 X g 원심분리에 의해서 대장균의 periplasm 과 cytoplasm의 단백질을 포함하는 분획을 얻을 수 있었다. 그리고 얻은 pellet은 1% Sarcosyl (N-lauryl sarcosinate, sodium salt)을 포함하는 완충용액 (PBS, pH 7.4)으로 부유시킨 후 4°C, 2시간 동안의 15,000 X g 원심분리에 의해서 상층액은 대장균의 inner membrane으로, pellet은 대장균의 outer membrane의 단백질로 그 분획을 얻은 후 각각의 분획을 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 S 항원에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅을 수행하여 각각의 대장균 분획 중 S 항원의 중화항체 형성 항원기가 outer membrane에 위치함을 확인하였다(도 4B; 대장균 membrane 분획 웨스턴 블롯 결과). 도에서 레인 1은 형질전환되지 않은 JM109, 레인 2는 형질전환된 pGNBCA-HB168/JM109의 whole cell, 레인 3은 형질전환된 pGNBCA-HB168/JM109의 soluble 분획, 레인 4는 형질전환된 pGNBCA-HB168/JM109의 innermembrane 분획, 레인 5는 형질전환된 pGNBCA-HB168/JM109의 outermembrane 분획을 나타낸다.

<69> S 항원의 중화항체 형성 항원기의 발현이 폴리감마글루탐산 합성 단백질의 C-말단에 의해 대장균의 표면에 발현됨을 형광-활성 세포 선별 측정방법 (Fluorescence-activating cell sorting (FACS) flow cytometry)으로 확인하였다. 면역 형광(immunofluorescence) 염색을 위하여 발현을 유도시킨 대장균을 동일한 세포 농도가 되도록 수확하고 세포를 완충용액 (PBS buffer, pH 7.4)으로 여러 번 세척한 다음, 1 % 소혈청 알부민을 함유하는 완충용액 1 ml에 부유시키고 S 항원에 대한 양 유래의 폴리클론 1차 항체를 1000배 희석하여 4°C에서 12시간 동안

반응시켰다. 반응이 끝난 세포들은 완충용액으로 여러 번 세척하고 1 % 소혈청 알부민을 함유하는 완충용액 1 ml 에 부유시킨 다음 바이오틴이 결합되어 있는 2차 항체를 1000배 희석하여 4℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 다시 반응이 끝난 세포는 완충용액으로 여러 번 세척하고 1 % 소혈청 알부민이 들어있는 완충용액 0.1 ml 에 부유시킨 다음 바이오틴에 특이적인 스트렙토아비딘-R-피코에리트린 (streptavidin-R- phycoerythrin) 염색시약을 1000배 희석하여 결합시켰다.

<70> 반응이 끝난 대장균을 여러 번 세척하고 형광-활성 세포 선별 측정방법으로 측정한 결과, 형질전환되지 않은 대장균과 비교되는 S 항원의 중화항체 형성 항원기 단백질이 표면에 발현됨을 확인하였다(도 4에서 B). 도에서 흰색은 형질전환되지 않은 JM109, 검은색은 형질전환된 pGNBCA-HB168/JM109에서 유래된 것을 나타낸다. 도면에서 보는 바와 같이, 형질전환되지 않은 대장균에서는 S 항원 중화항체 형성기가 발현되지 않았으나, 표면 발현용 벡터에 의해 형질전환이 된 대장균의 S 항원 중화항체 형성기의 표면 발현이 명확히 확인되었다.

<71> (간접실시에 2) 표면 발현용 전환 벡터 pGNCA-HB168의 제조 및 B형 간염 바이러스 S 항원의 중화항체 형성 항원기 표면 발현

<72> 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자(pgsBCA) 중 pgsC와 pgsA를 이용한 그람음성 미생물을 숙주로 하는 표면 발현용 벡터를 제조하였다.

<73> 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질중 pgsC와 pgsA의 N-말단과 C-말단을 암호화하는 유전자를 얻기 위하여, 상기 총염색체를 주형으로 사용하고 N-말단에는 서열

8(5-gca cat atg ttc gga tca gat tta tac atc-3), C-말단에는 서열 9(5-ctc gga tcc ttt aga ttt tag ttt gtc act-3)의 염기서열을 갖는 올리고 뉴클레오타이드를 프라이머로 이용한 중합 효소 연쇄반응을 수행하였다.

<74> N-말단에 대한 프라이머인 서열에는 발현벡터 pHCE 19T(II)에 존재하는 제한효소 Nde I 인식부위가 존재하도록 구성하였다. 이때 증폭한 유전자 부위는 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질 유전자인 pgsC의 N-말단부위부터 pgsA의 C-말단부위까지 약 1.6 kb의 크기였다.

<75> 중합 효소 연쇄반응에 의하여 증폭된 유전자를 제한효소 Nde I과 BamH I으로 절단하고 이미 Nde I과 BamH I으로 절단된 항시적 고발현 벡터인 pHCE 19T(II)에 삽입하여 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자에 번역 끝 코돈이 없고 새로운 제한효소 인식 부위가 첨가된 새로운 약 5.3 kb 크기의 벡터를 제조하고 이를 pGNCA로 명명하였다.

<76> 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자(pgsBCA) 중 pgsC와 pgsA를 이용하여 그람음성 미생물을 숙주로 하여 B형 간염 바이러스 S 항원의 중화항체 형성 항원기를 표면 발현할 수 있는 전환 벡터 pGNCA-HB168을, 전기 실시예 2에서와 동일한 방법으로 제조하였다. 이렇게 제조한 전환 벡터 pGNCA-HB168를 도 5에 나타내었다.

<77> 상기 표면 발현용 벡터 pGNCA-HB168를 이용하여 대장균에서 B형 간염 바이러스 S 항원의 중화항체 형성 항원기의 발현을 조사하였다.

<78> 이를 위해 상기 발현 벡터를 대장균에 형질전환시키고 전기 실시예 3에서와 동일한 과정으로 발현을 유도한 다음 세포외막 단백질 pgsCA와 융합된 S 항원의 중화항체 항원기가 대장균

에서 발현되었음을 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 S 항원에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅을 수행하여 확인하였다.

<79> 도 6에서 라인 1은 형질전환되지 않은 숙주세포인 JM109, 라인 2는 형질전환된 pGNCA-HB168/JM109이다. 도면에서 보는 바와 같이, pGNCA-HB168 플라스미드에 의해서 약 48 KDa의 융합 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다.

【발명의 효과】

<80> 본 발명자들은 바실러스속 균주 유래의 폴리 감마 글루탐산의 합성 유전자(pgsBCA)를 이용하여 인간 파필로마바이러스의 캡시드 L1 단백질을 미생물의 표면에, 특히 경구투여 가능한 유산균 표면 및 백신 균주인 살모넬라균주의 표면에 효과적으로 발현하는 방법 및 그의 용도를 개발하였고, 이 재조합균주는 HPV의 예방 및 치료를 위한 백신 등의 개발에 사용이 될 수 있다. 특히 HPV의 항체 유도를 위한 항원의 대량 생산이 안됨을 고려한다면 본 발명의 HPV 항원을 발현하는 재조합 균주를 경제적으로 싸게 대량 증식시켜 경구 백신으로 직접 혹은 질 부위에 직접 적용이 가능한 경제성 있는 백신으로 사용할 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 pgsB, pgsC 및 pgsA 중 어느 하나 또는 둘 이상과, 인간 파필로마바이러스의 표면 항원단백질 유전자를 포함하는 백신제조용 벡터.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

상기 표면 항원단백질 유전자는, 인간 파필로마바이러스의 캡시드인 HPV 16 L1, HPV 16 L2, HPV 18 L1 및 HPV 18 L2로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 항원단백질 유전자인 것을 특징으로 하는 백신제조용 벡터.

【청구항 3】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자는 pgsA를 포함하는 것을 특징으로 하는 백신제조용 벡터.

【청구항 4】

제 1 항 내지 제 3 항에 의한 백신제조용 벡터로 형질전환된 미생물.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서,

상기 미생물은 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마 이코박테리움 보비스, 시겔라, 바실러스, 락토바실러스, 락토코커스, 스테필로코커스, 리스테 리아 모노사이토제네스 및 스트렙토코커스로 이루어지는 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 형 질전환된 미생물.

【청구항 6】

항원 단백질이 표면에 발현된 제 5 항에 의한 미생물, 상기 미생물로부터 조추출된 항원 단백질 또는 상기 미생물로부터 정제된 항원 단백질을 유효성분으로 하는 점막 종양 치료 또는 예방용 백신.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서,

경구용 또는 식용으로 섭취하는 것을 특징으로 하는 점막 종양 치료 또는 예방용 백신.

【청구항 8】

제 6 항에 있어서,

피하 또는 복강 주사용인 것을 특징으로 하는 점막 종양 치료 또는 예방용 백신.

【청구항 9】

제 1 항에 있어서,

상기 박터는 도 1에 도시된 유전자 지도를 가지는 플라스미드 pHCE2LB:pgsA-HPVL1인 것을 특징으로 하는 백신제조용 박터.

【청구항 10】

제 9 항에 의한 백신제조용 박터로 형질전환된 미생물.

【청구항 11】

제 9 항에 의한 백신제조용 박터로 형질전환된 대장균(KCTC 10349BP).

【청구항 12】

제 9 항에 의한 백신제조용 박터로 형질전환된 락토바실러스 또는 살모넬라.

【청구항 13】

항원 단백질이 표면에 발현된 제 12 항에 의한 미생물, 상기 미생물로부터 추출된 항원 단백질 또는 상기 미생물로부터 정제된 항원 단백질을 유효성분으로 하는 점막 종양 치료 또는 예방용 백신.

【청구항 14】

제 13 항에 있어서,

경구용 또는 식용으로 섭취하는 것을 특징으로 하는 점막 종양 치료 또는 예방용 백신.

【청구항 15】

제 13 항에 있어서,

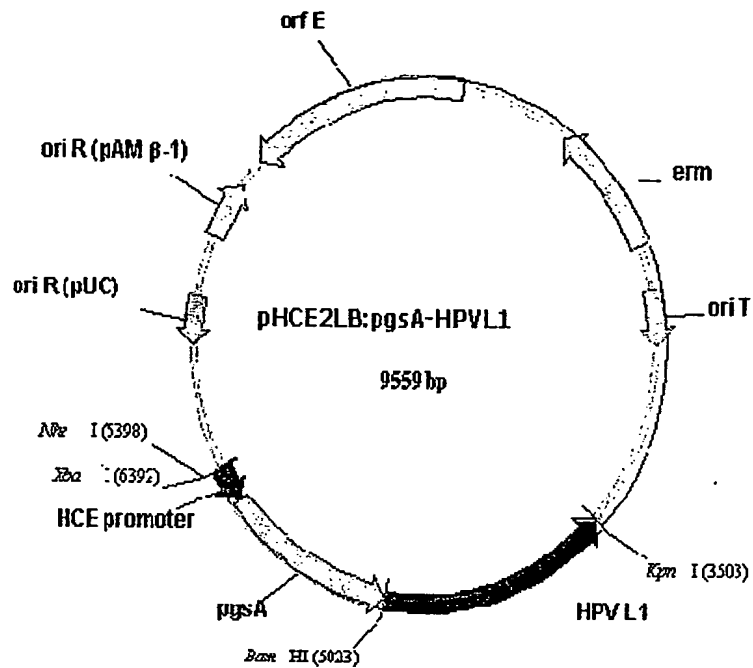
피하 또는 복강 주사용인 것을 특징으로 하는 점막 종양 치료 또는 예방용 백신.

【청구항 16】

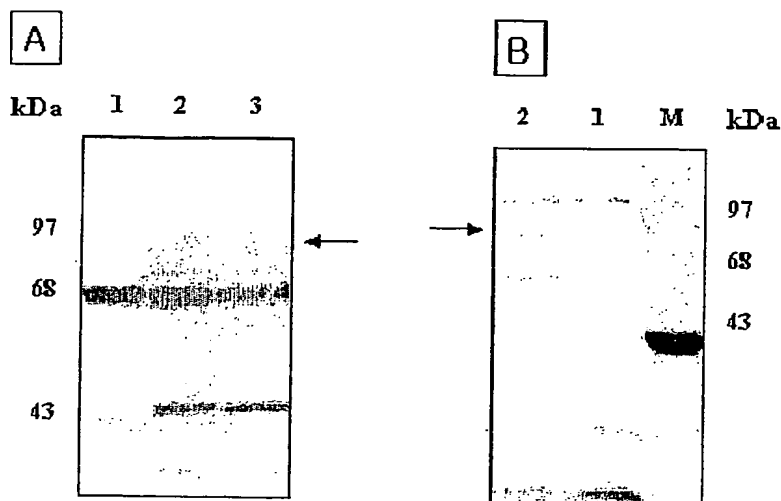
항원 단백질이 표면에 발현된 제 12 항에 의한 미생물, 상기 미생물로부터 추출된 항원 단백질 또는 상기 미생물로부터 정제된 항원 단백질을 유효성분으로 하는 생식기 세척액.

【도면】

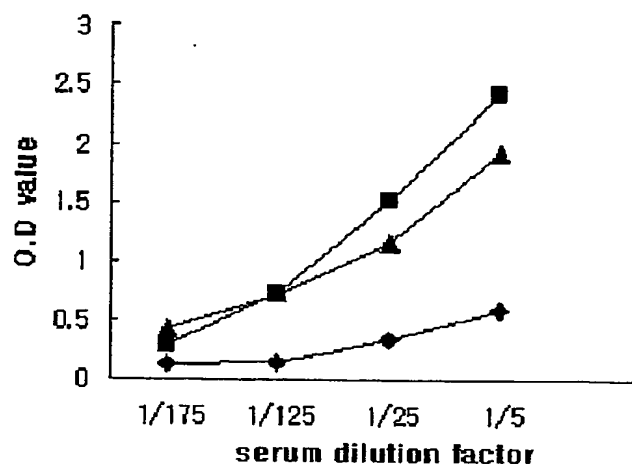
【도 1】



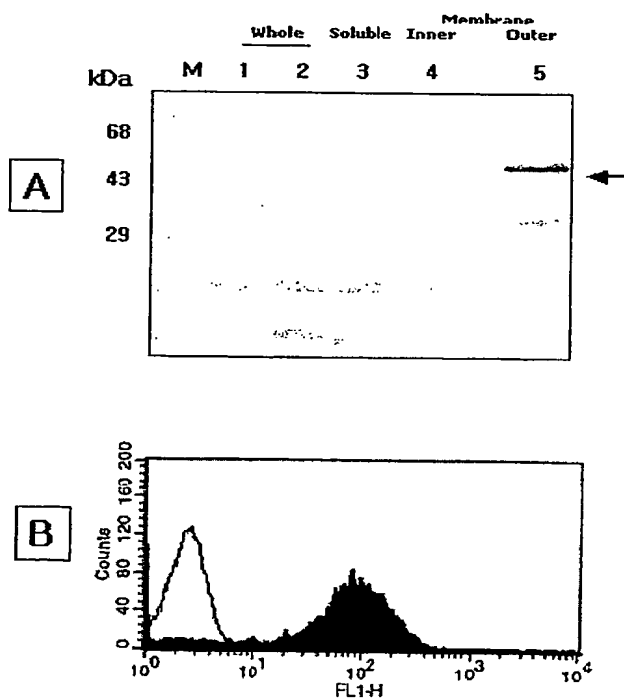
【도 2】



【도 3】



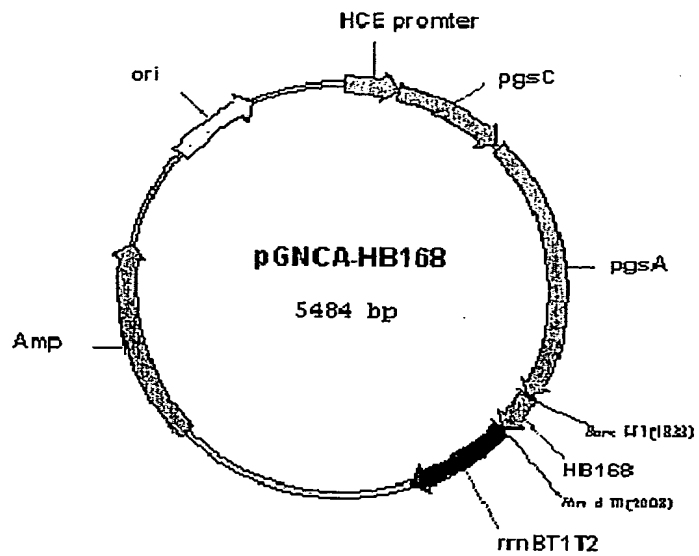
【도 4】



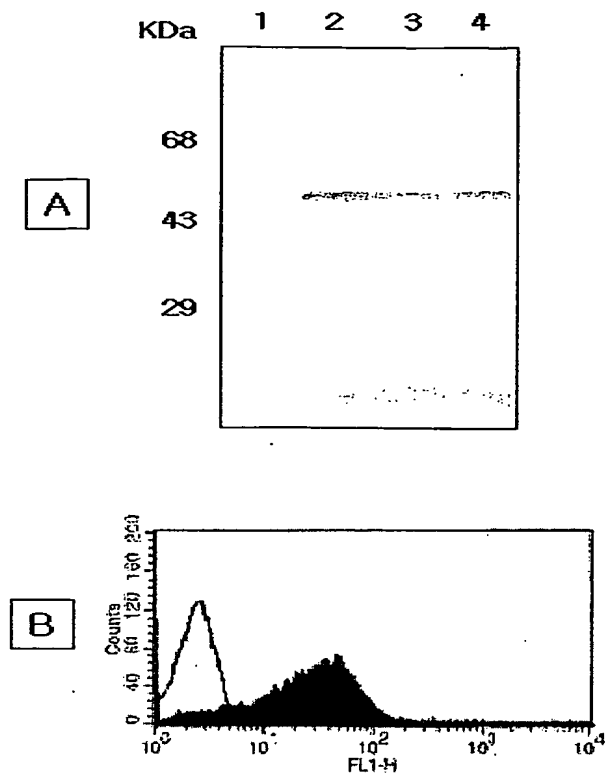
10 63378

출력 일자: 2003/10/25

【도 5】



【도 6】



【서열목록】

<110> Bioleaders <120> Vector for anti-HPV vaccine and Transformed
 Microorganism by the vector <160> 9 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1
 <211> 1182 <212> DNA <213> Bacillus subtilis <400> 1 atgggctggt
 tactcattat agcctgtgct gtcatactgg tcatcggaat attagaaaaa 60 cgacgacatc
 agaaaaacat tgatgccctc cctgttcggg tgaatattaa cggcacccgc 120 ggaaaaatcga
 ctgtgacaag gctgacaacc ggaatattaa tagaagccgg ttacaagact 180 gttggaaaaa

caacaggaac agatgcaaga atgatttact gggacacacc ggaggaaaag	240 ccgattaaac
ggaaacctca ggggccgaat atcggagagc aaaaagaagt catgagagaa	300 acagtagaaa
gaggggctaa cgcgattgtc agtgaatgca tggctgttaa cccagattat	360 caaatcatct
ttcaggaaga acttctgcag gccaatatcg gcgtcattgt gaatgtttta	420 gaagaccata
tggatgtcat ggggccgacg cttgatgaaa ttgcagaagc gtttaccgct	480 acaattcctt
ataatggcca tcttgtcatt acagatagtg aatataccga gttctttaaa	540 caaaaagcaa
aagaacgaaa cacaaaagtc atcattgctg ataactcaaa aattacagat	600 gagtatttac
gtaattttga atacatggta ttccctgata acgcttctct ggcgctgggt	660 gtggctcaag
cactcggcat tgacgaagaa acagcattta agggaatgct gaatgcgccg	720 ccagatccgg
gagcaatgag aattcttccg ctgatcagtc cgagcgagcc tgggcacitt	780 gttaatgggt
ttgccgcaaa cgacgcttct tctactttga atatatggaa acgtgtaaaa	840 gaaatcggtt
accgaccga tgatccgac atcatcatga actgccgcgc agaccgtgtc	900 gatcggacac
agcaattcgc aatgacgta ttgccctata ttgaagcaag tgaactgatc	960 ttaatcggtg
aaacaacaga accgatcgtg aaagcctatg aagaaggcaa aattcctgca	1020 gacaaactgc
atgacctaga gtataagica acagatgaaa ttatggaatt gttaaagaaa	1080 agaatgcaca
accgtgtcat atatggcgtc ggcaatattc atggtgccgc agagccttta	1140 attgaaaaaa
tccacgaata caaggtaaag cagctcgtaa gc	1182 <210> 2 <211>
447 <212> DNA <213> Bacillus subtilis <400> 2 atgttcggat cagatttata	
catcgacta attttaggtg tactactcag ttttaatttt	60 gcggaaaaaa cagggatcgt
gccggcagga cttgtgttac cgggatattt aggacttgtg	120 tttaatcagc cggtctttat
tttacttgtt ttgctagtga gcttgtcac ttatgttadc	180 gtgaaatagc gtttatccaa

atttatgatt ttgtacggac gcagaaaatt cgctgccatg 240 ctgataacag ggatcgtcct
 aaaaatcgcg ttgtattttc tatacccgat tgtaccattt 300 gaaatcgag aatttcgagg
 aatcggcac atcgtgccag gtttaattgc caataccatt 360 cagaaacaag gtttaaccat
 tacgttcgga agcacgctgc tattgagcgg agcgaccttt 420 gctatcatgt ttgtttacta ctttaatt
 447 <210> 3 <211> 1140 <212> DNA <213> Bacillus subtilis <400> 3
 atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag 60
 aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgatcggtt ttgtccttat gttcgttttc 120
 atgtggcgga gaaaagcgga aacgccgaag gtcaaacgt attctgacga cgtactctca 180
 gcctcatttg taggcgatat tatgatggga cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa 240
 ggggcagaca gtatttttca atatgttgaa ccgatcttta gagcctcgga ttatgtagca 300
 ggaaactttg aaaacccggt aacctatcaa aagaattata aacaagcaga taaagagatt 360
 catctgcaga cgaataagga atcagtgaag gtcttgaagg atatgaattt cacggttctc 420
 aacagcgcca acaaccacgc aatggattac ggcgttcagg gcatgaaaga tacgcttgga 480
 gaatttgcga agcaaaacct tgatatcgtt ggagcgggat acagcttaag tgatgcgaaa 540
 aagaaaattt cgtaccagaa agtcaacggg gtaacgattg caacgcttgg ctttaccgat 600
 gtgtccggga aaggtttcgc ggctaaaaag aatacgccgg gcgtgctgcc cgcagatcct 660
 gaaatcttca tccctatgat ttcagaagcg aaaaaacatg ctgacattgt tgttgtgcag 720
 tcacactggg gccaaagata tgacaatgat ccaaacgacc gccagcgcca gcttgcaaga 780
 gccatgtctg atgcgggagc tgacatcatc gtcggccatc atccgcacgt cttagaaccg 840
 attgaagtat ataacggaac cgtcattttc tacagcctcg gcaactttgt ctttgaccaa 900
 ggctggacga gaacaagaga cagtgcactg gttcagtatc acctgaagaa aaatggaaca 960

ggccgctttg aagtgcacc gatcgatc catgaagcga cacctgcacc tgtgaaaaa 1020

gacagcctta aacagaaaac cattattcgc gaactgcga aagactctaa ttctgcttgg 1080

aaagtagaag acggaact gacgtttgat attgatcata gtgacaaact aaaatctaaa 1140

1140 <210> 4 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer <400> 4 cgcgatcct ctctttggct gcctag

26 <210> 5 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer <400> 5 ggaaagcttt tattacagct tacgtttttt g

31 <210> 6 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer <400> 6 ctgggatccc aaggtatgtt gcccgtttg

29 <210> 7 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer <400> 7 tgaagcttat taggacgatg ggatgggaat

30 <210> 8 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer <400> 8 gcacatatgt tcggatcaga ttatacatc

30 <210> 9 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer <400> 9 ctcgatcct ttagatttta gttgtcact

30